

# CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* SOB INFLUÊNCIA DOS HERBICIDAS GLYPHOSATE POTÁSSICO, FOMESAFEN, IMAZETHAPYR E CARFENTRAZONE-ETHYL<sup>1</sup>

Sergio de Oliveira Procópio<sup>2</sup>  
José Barbosa dos Santos<sup>2,4</sup>  
Rodrigo J. S. Jacques<sup>3</sup>  
Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>3</sup>  
Antonio Alberto da Silva<sup>2</sup>  
Ricardo Câmara Werlang<sup>2</sup>

## RESUMO

Avaliou-se o impacto de herbicidas sobre o crescimento de três estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizadas como inoculantes na cultura da soja no Brasil. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura à base de manitol e extrato de levedura. Foram avaliados 18 tratamentos: controle (sem adição de herbicida), glyphosate com sal potássico (glyphosate-K), fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl e carfentrazone-ethyl + glyphosate-K, e três estirpes de *Bradyrhizobium*: SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e SEMIA 5019 e SEMIA 587 (*B. elkanii*), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 6 x 3, com seis repetições. Os efeitos dos tratamentos no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* foram avaliados pela leitura da densidade ótica em espectrofotômetro. As concentrações dos herbicidas foram: 12,9; 3,6; 1,4; e 1,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, de glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. Foram feitas curvas de crescimento para cada estirpe. Os valores de inibição de crescimento variaram desde zero (SEMIA 587, mediante ação de carfentrazone-ethyl) a 53% (SEMIA 5019, sob ação do fomesafen). Carfentrazone-ethyl foi o herbicida menos tóxico, e imazethapyr e fomesafen os mais tóxicos. As estirpes foram mais sensíveis ao glyphosate-K puro do que em mistura com carfentrazone-ethyl. A ordem crescente de tolerância das

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 17.09.2003.

<sup>2</sup> Departamento de Fitotecnia da UFV. 36570-000 Viçosa, MG.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia da UFV.

<sup>4</sup> Autor para correspondência. E-mail: jbarbosasantos@yahoo.com.br

estirpes aos herbicidas foi a seguinte: SEMIA 5019 < SEMIA 5079 < SEMIA 587, com o glyphosate-K, e SEMIA 5019 < SEMIA 5079 = SEMIA 587, com o imazethapyr e fomesafen.

Palavras-chave: *Glycine max*, fixação biológica de N<sub>2</sub>, rizóbio.

## ABSTRACT

### GROWTH OF *Bradyrhizobium* STRAINS UNDER THE INFLUENCE OF THE HERBICIDES GLYPHOSATE-K, FOMESAFEN, IMAZETHAPYR AND CARFENTRAZONE-ETHYL

This work evaluated herbicide impact on three *Bradyrhizobium* strains, SEMIA 5079 (*B. japonicum*) and SEMIA 5019 and SEMIA 587 (*B. elkanii*), used in soybean crop in Brazil. The strains were inoculated in yeast extract manitol and 18 treatments were evaluated: control (without herbicide), glyphosate potassic salt (glyphosate-K), fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl and carfentrazone-ethyl + glyphosate-K, and three *Bradyrhizobium* strains (SEMIA 5019, SEMIA 5079 and SEMIA 587), arranged in a completely randomized design, in a 6 x 3 factorial scheme, with six replications. The effects of the treatments on the growth of the *Bradyrhizobium* strains were evaluated by optic density reading in spectrophotometer. The herbicide concentrations were: 12.9, 3.6, 1.4 and 1.8 µg L<sup>-1</sup>, respectively, for glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr and carfentrazone-ethyl. Growth curves were made for each strain. The observed growth inhibition values varied from zero (SEMIA 587 by carfentrazone-ethyl action) to 53% (SEMIA 5019 by fomesafen action). Carfentrazone-ethyl was the less toxic herbicide and imazethapyr and fomesafen the most toxic, for the strains evaluated. The strains were more sensitive to glyphosate-K alone than mixed with carfentrazone-ethyl. The increasing order of strain tolerance to the herbicides was the following: SEMIA 5019 < SEMIA 5079 < SEMIA 587, for glyphosate-K, and SEMIA 5019 < SEMIA 5079 = SEMIA 587 for imazethapyr and fomesafen.

Key words: *Glycine max*, biological fixation of N<sub>2</sub>, rhizobium.

## INTRODUÇÃO

A utilização de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio (N<sub>2</sub>) (*Bradyrhizobium* spp.), aplicados junto às sementes de soja, é prática usual na condução desta cultura. Esta operação tem apresentado resultados altamente positivos, principalmente em solos onde a cultura ainda não foi cultivada, ou em solos com poucos anos de cultivo de soja. A fixação de N<sub>2</sub> atmosférico, realizada pela associação soja-rizóbio, pode contribuir com mais de 70% do N total necessário à cultura (10, 16); isso pode representar, para o Brasil, economia equivalente a 290 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de sulfato de amônio.

A soja, no Brasil, é a cultura em que mais se aplicam herbicidas: 39,8% de um total de 174 mil toneladas de produtos formulados (15). Pode-se afirmar que, com exceção dos cultivos orgânicos, que visam ao

consumo de soja sem agroquímicos, praticamente em toda área cultivada com esta cultura aplicam-se herbicidas. A grande aceitação dos produtores de soja a esses insumos deve-se à alta eficiência no controle das plantas daninhas, ao alto rendimento operacional, aos herbicidas altamente seletivos aos principais cultivares nacionais, e ao menor custo, quando comparado aos outros métodos de controle.

Apesar da grande importância dos herbicidas na cultura da soja, esses compostos podem apresentar efeitos deletérios ao processo de fixação de N pela simbiose soja-bactéria (5, 7, 14). Esses efeitos podem ser diretos (prejudicando os rizóbios), indiretos (prejudicando as plantas hospedeiras e/ou estimulando microrganismos antagônicos aos rizóbios), ou em ambos os processos (2, 11). Herbicidas que afetam a formação e o crescimento de pêlos radiculares podem prejudicar a infecção das bactérias (5). O declínio induzido pelos herbicidas na nodulação de leguminosas pode ser o resultado de injúrias ao sistema radicular dessas espécies ou dos efeitos tóxicos aos rizóbios antes ou durante o processo de infecção (3), todavia, também pode ser devido à redução na atividade da nitrogenase, provocada pelo déficit de suprimentos de fotoassimilados aos rizóbios, causado por injúrias dos herbicidas às plantas. Os herbicidas também podem prejudicar a nodulação, por inibirem a produção de enzimas celulíticas e pectolíticas produzidas pelos rizóbios e essenciais ao processo de penetração nos pêlos radiculares (9). A informação tolerância e/ou sensibilidade a herbicidas deveria ser considerada na seleção e produção de inoculantes comerciais, para melhor rendimento destes no processo de simbiose (8).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em laboratório, os efeitos diretos de diversos herbicidas, freqüentemente empregados na cultura da soja, sobre o crescimento de três das principais estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas para inoculação nas sementes de soja no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Associações Biológicas, pertencente ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, onde foram avaliados 18 tratamentos: controle (sem adição de herbicida), glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl e carfentrazone-ethyl + glyphosate-K, e três estirpes de *Bradyrhizobium*: *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e de *B. japonicum* (SEMIA 5079), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 6 x 3, com seis repetições.

As soluções-estoque dos herbicidas glyphosate potássico (K), fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl e carfentrazone-ethyl +

glyphosate-K foram preparadas pela mistura das formulações comerciais com água destilada e deionizada, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Milipore 0,25  $\mu\text{m}$ ) em condições assépticas.

As estirpes de *Bradyrhizobium* foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em frascos de ágar inclinado com meio à base de extrato de levedura e manitol como fonte de carbono (meio YEM), composto, em  $\text{g L}^{-1}$ , por: manitol, 10;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05;  $\text{MgSO}_4$ , 0,02;  $\text{NaCl}$ , 0,01; extrato de levedura, 0,5; ágar, 15 e com pH ajustado em 6,8, a 4°C. A ativação dessas culturas foi realizada segundo método descrito pela Embrapa (4), sendo feita, posteriormente, sua inoculação em erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio YEM líquido, incubados em agitador rotatório a 150 rpm e a 25°C, até atingir densidade ótica (DO) a 560 nm, equivalente a  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

O efeito do herbicida no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* foi avaliado pela leitura da DO em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII), a 560 nm, em intervalos de quatro em quatro horas, até completarem 24 horas e, após, de 12 em 12 horas, até a paralisação do crescimento. Para isso, foram utilizadas placas de ELISA com 96 células de 300  $\mu\text{L}$  de capacidade volumétrica, onde foram adicionados 180  $\mu\text{L}$  de meio YEM líquido estéril (1,5 vez concentrado), 60  $\mu\text{L}$  da solução-estoque estéril dos herbicidas e 15  $\mu\text{L}$  das culturas ativadas, totalizando 255  $\mu\text{L}$  de solução. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro, em câmara de crescimento a 25°C, de onde foram retiradas somente para as leituras de DO e imediatamente recolocadas nesse local, até o final das leituras. As concentrações dos herbicidas foram: 12,9; 3,6; 1,4; e 1,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  (correspondentes a 1,50; 0,25; 0,10; e 0,12  $\text{kg ha}^{-1}$  do produto técnico), respectivamente, de glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. Os resultados, após 134 horas de incubação, foram submetidos à análise de regressão para traçar curvas de crescimento bacteriano durante o período de incubação, nos diferentes tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada resposta diferenciada no crescimento das estirpes sob efeito dos herbicidas (Figuras 1, 2 e 3).

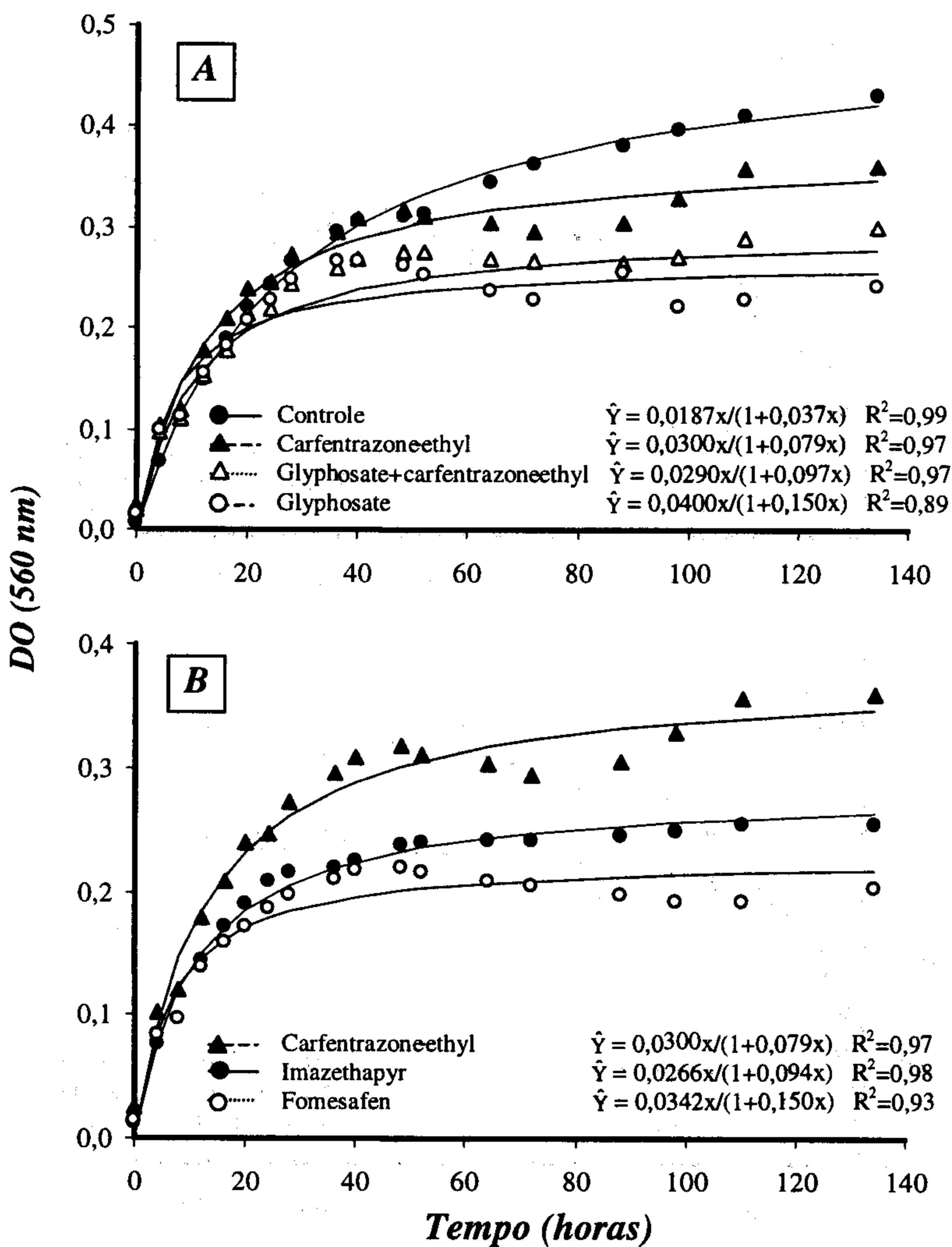


FIGURA 1 - Efeito dos herbicidas glyphosate-K ( $12,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e carfentrazoneethyl ( $1,80 \mu\text{g L}^{-1}$ ), puros e em mistura (A), e entre os herbicidas carfentrazoneethyl ( $1,80 \mu\text{g L}^{-1}$ ), imazethapyr ( $1,40 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e fomesafen ( $3,60 \mu\text{g L}^{-1}$ ) aplicados puros (B), sobre o crescimento da estirpe de *B. elkanii* SEMIA 5019, medido pelo aumento da densidade ótica (DO).

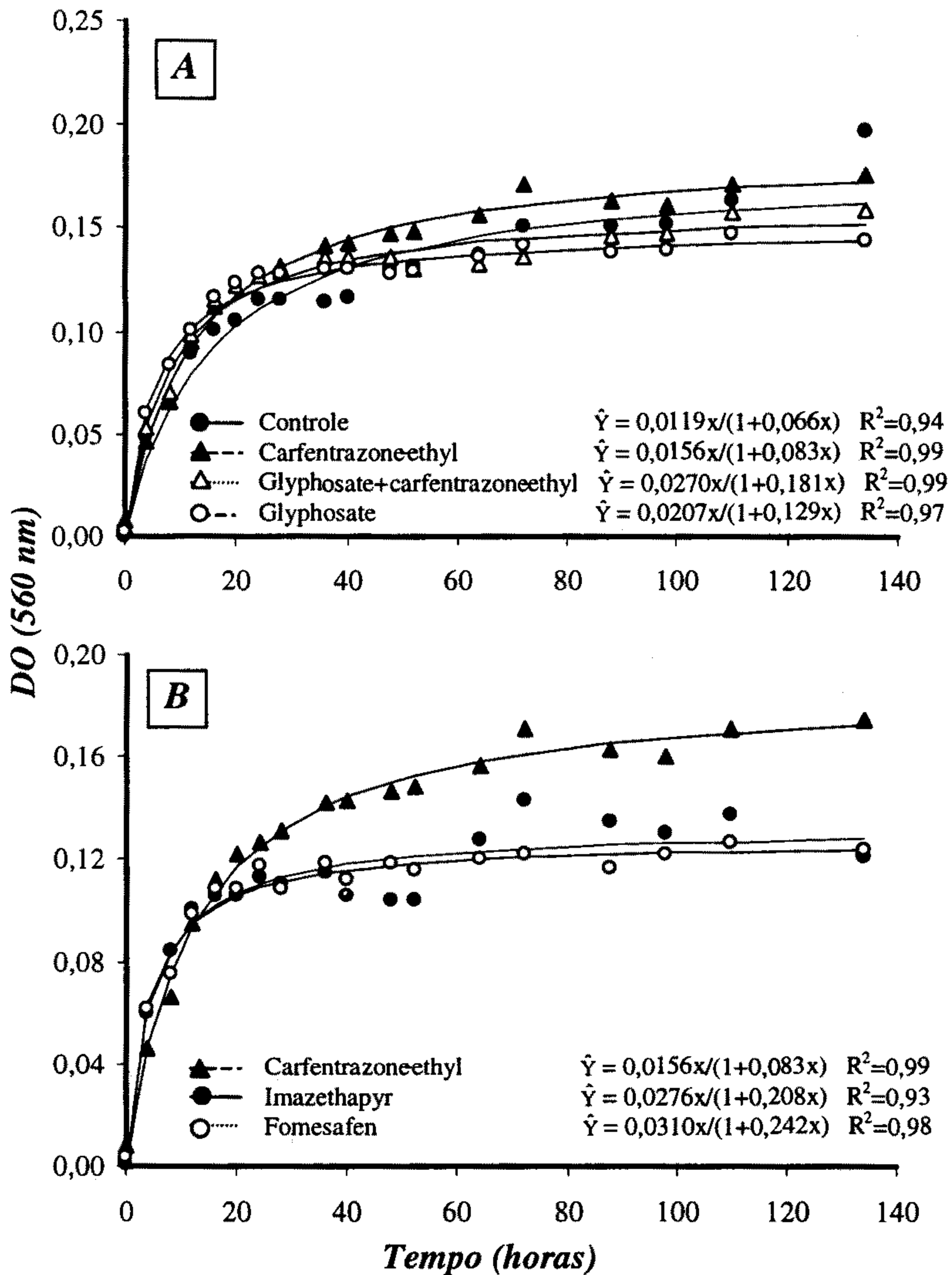


FIGURA 2 - Efeito dos herbicidas glyphosate-K ( $12,96 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e carfentrazone-ethyl ( $1,80 \mu\text{g L}^{-1}$ ), puros e em mistura (A), e entre os herbicidas carfentrazone-ethyl ( $1,80 \mu\text{g L}^{-1}$ ), imazethapyr ( $1,40 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e fomesafen ( $3,60 \mu\text{g L}^{-1}$ ) aplicados puros (B), sobre o crescimento da estirpe de *B. japonicum* SEMIA 5079, medido pelo aumento da densidade ótica (DO).

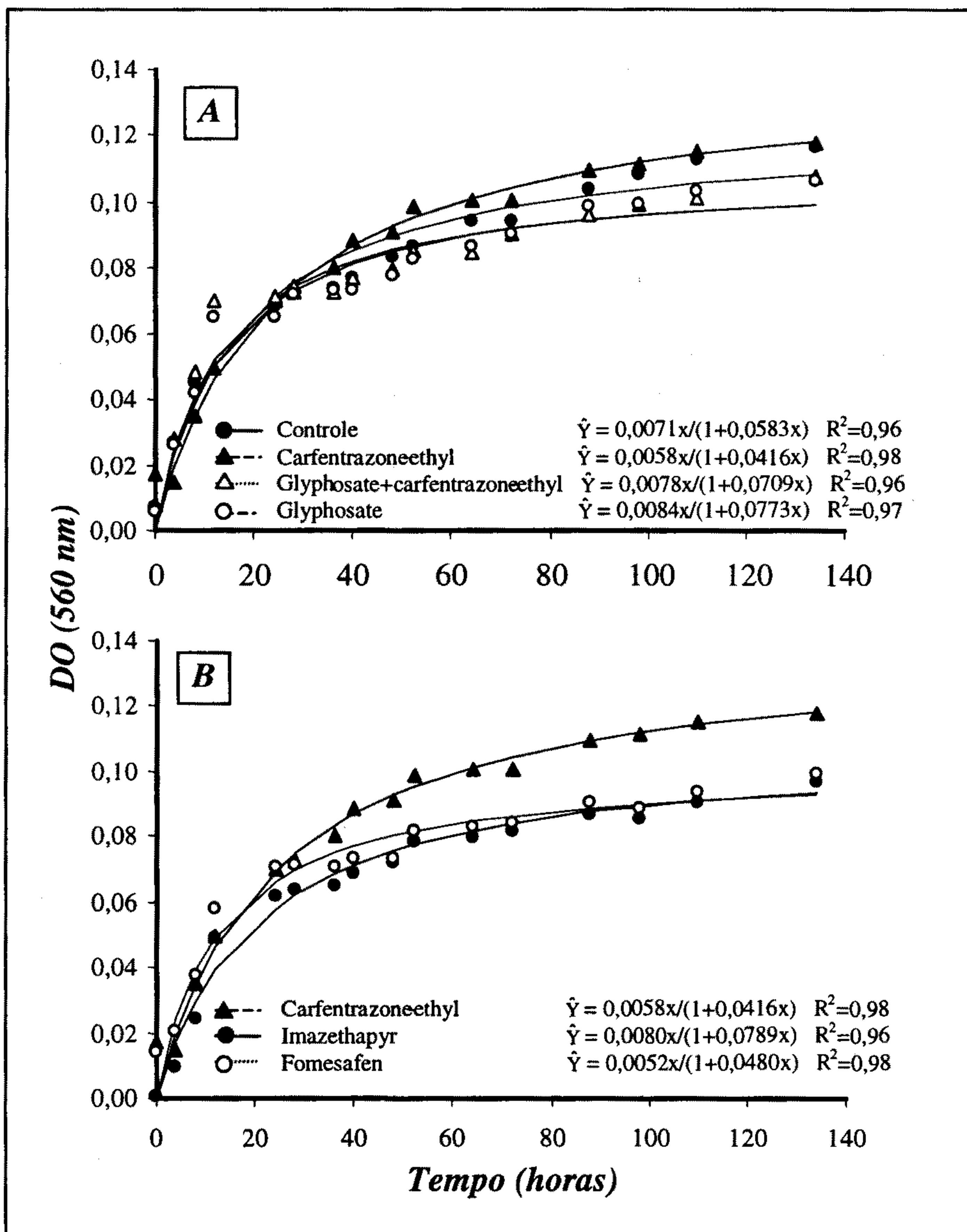


FIGURA 3 - Efeito dos herbicidas glyphosate-K (12,96 µg L<sup>-1</sup>) e carfentrazone-ethyl (1,80 µg L<sup>-1</sup>) puros e em mistura (A), e entre os herbicidas carfentrazone-ethyl (1,80 µg L<sup>-1</sup>), imazethapyr (1,40 µg L<sup>-1</sup>) e fomesafen (3,60 µg L<sup>-1</sup>) aplicados puros (B), sobre o crescimento da estirpe de *B. elkanii* SEMIA 587, medido pelo aumento da densidade ótica (DO).

Observou-se efeito tóxico dos herbicidas sobre a estirpe SEMIA 5019 a partir de 20 horas da inoculação (Figura 1). Foi possível distinguir níveis de toxidez entre os tratamentos, sendo carfentrazone-ethyl o herbicida que causou menor toxicidade a SEMIA 5019 (Figura 1). Sob influência do glyphosate-K técnico, essa estirpe mostrou-se menos tolerante do que quando submetida à mistura glyphosate-K + carfentrazone-ethyl (Figura 1.A). Observou-se redução no crescimento variando de 17% (carfentrazone-ethyl) até 48% (fomesafen), 134 horas após a inoculação (Figura 1.B). A possível causa da alta toxicidade do fomesafen a esse rizóbio pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, o qual é inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase (protox), fazendo com que haja acúmulo de protoporiirina IX em células tratadas com este herbicida, ocasionando a interação com o oxigênio e a luz, produzindo as formas reativas do oxigênio e conseqüente peroxidação dos lipídios e morte celular. O fato de as placas terem sido incubadas no escuro não impediu a ação do fomesafen porque, em grande parte do período de incubação, durante o tempo de cada leitura, as placas recebiam em torno de 20 minutos de iluminação artificial, totalizando, aproximadamente, 5 horas e 20 minutos, suficientes para a ação tóxica do produto. Outra possível causa para esse efeito pode ser atribuída à toxicidade de um ou mais ingredientes na formulação comercial do produto. Todavia, pode ter havido interação entre esses dois fatores. Wilkinson e Lucas (17) observaram que a formulação comercial do paraquat aumentava seu efeito tóxico contra fungos, quando comparado ao ingrediente ativo puro.

As curvas de crescimento de SEMIA 5079, com os tratamentos carfentrazone-ethyl, glyphosate-K e a mistura destes, mostraram nível de toxidez semelhante, ficando próximo ao tratamento-controle sem adição de herbicida, inclusive com crescimento relativo maior causado pelo carfentrazone-ethyl (Figura 2.A). Quando se compara o efeito dos herbicidas em aplicação isolada sobre a estirpe SEMIA 5079 ao final do período de incubação, verifica-se que os tratamentos imazethapyr e fomesafen causaram a maior toxicidade, com redução no crescimento dessa estirpe de 21 e 23%, respectivamente (Figura 2.B). Nos demais tratamentos, os valores de inibição foram de 11%, na mistura carfentrazone-ethyl + glyphosate-K, e 8%, com glyphosate-K (Figura 2.A). Ao longo do período de avaliação, o fomesafen e o imazethapyr provocaram padrão semelhante de crescimento em SEMIA 5079 (Figura 2.B).

A estirpe SEMIA 587 mostrou-se menos sensível aos tratamentos com herbicidas ao longo do período de avaliação (Figura 3). Nos tratamentos com carfentrazone-ethyl, glyphosate-K e a mistura destes, o padrão de crescimento de SEMIA 587 foi semelhante ao do controle (Figura 3.A). Com o imazethapyr e fomesafen, essa estirpe apresentou padrões de crescimento semelhantes, todavia, menores que o do controle (Figura 3.B).



A redução no crescimento de SEMIA 587, tanto com imazethapyr quanto com fomesafen, foi de 14% (Figura 3.B).

Esta sensibilidade diferencial entre as estirpes pode estar relacionada a suas características particulares de absorção do produto. Outros autores (6) testaram o glyphosate (sal de isopropilamina) puro e na formulação comercial Roundup, com concentrações variando entre 25 e 100 mg L<sup>-1</sup>, sobre bactérias do gênero *Enterobacter*, e observaram redução no crescimento, todavia, com maior toxicidade na formulação comercial com maior concentração. Em trabalho para verificar os efeitos do glyphosate sobre duas estirpes de *B. japonicum*, foi observado que, aos quatro dias após inoculação, em meio contendo 1mM deste herbicida, a USDA 110 teve 47% de inibição, contra 19% da USDA 138 (12). Ao mesmo tempo, o acúmulo de ácido shiquímico foi 37,5% maior na USDA 110, comparada à USDA 138 (12).

Carfentrazone-ethyl, além de ter proporcionado menor inibição no crescimento em todas as estirpes, reduziu a toxicidade do glyphosate quando em mistura. Os tratamentos que se mostraram mais tóxicos foram fomesafen e imazethapyr.

A causa da toxicidade do imazethapyr sobre estirpes de *B. japonicum* pode estar ligada ao seu efeito de inibição sobre a enzima acetohidroxiato sintetase (AHAS), bloqueando, assim, a síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina e proporcionando menor produção de proteínas (1). Em outro trabalho (5), o *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* mostrou-se tolerante ao imazethapyr. Todavia, há relatos de trabalhos com herbicidas inibidores da enzima AHAS em diferentes doses, sendo observado que eles afetaram drasticamente as estirpes de *Bradyrhizobium* (1). A diferença na suscetibilidade de estirpes a herbicidas foi também observada por outros pesquisadores (13), que concluíram que a estirpe de *B. elkanii* SEMIA 587 foi mais sensível ao trifluralin que a SEMIA 5019.

## CONCLUSÕES

- 1) Observa-se sensibilidade diferencial aos herbicidas, entre as estirpes.
- 2) Entre as estirpes, SEMIA 5019 mostra-se mais sensível aos herbicidas.
- 3) O efeito tóxico do glyphosate potássico sobre as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 e SEMIA 5079 é diminuído quando em mistura ao carfentrazone-ethyl.
- 4) Imazethapyr e fomesafen são os herbicidas mais tóxicos às estirpes.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à empresa Syngenta Proteção de Cultivos, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. ARRUDA, J.S.; LOPES, N.F. & MOURA, A.B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. *Planta Daninha*, 19: 111-8, 2001.
2. CARDINA, J. & HARTWIG, N.L. Atrazine, bifenox and shade effects on crownvetch (*Coronilla varia*) nodulation and nodule activity. *Weed Science*, 36: 535-9, 1988.
3. EBERBACH, P.L. & DOUGLAS, L.A. Herbicide effects on the growth and nodulation potencial of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. *Plant Soil*, 119: 15-23, 1989.
4. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola. Brasília, 1994. 542p.
5. GONZALEZ, A.; GONZALEZ-MURUA, C. & ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with pea (*Pisum sativum*). *Weed Science*, 44: 31-7, 1996.
6. HAAHTELA, K.; KILPI, S. & KARI, K. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 123-7, 1988.
7. HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZAOLA, J.I. & BACERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural Food Chemical*, 47: 2920-5, 1999.
8. KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; LIFSHITZ, N. & GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. *Weed Research*, 28: 291-6, 1988.
9. MAHMOUD, A.L.E. & OMAR, S.A. Growth, cell wall-degrading enzymes and aflatoxin production by lemon-rotting fungi in relation to insecticide application. *Microbiological Resistance*, 150: 195-200, 1995.
10. MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. & MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5: 121-6, 1993.
11. MOORMAN, T.B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. *Weed Science*, 34: 628-33, 1986.
12. MOORMAN, T.B.; BECERRIL, J.M.; LYDON, J. & DUKE, S.O. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural Food Chemical*, 40: 289-93, 1992.
13. ORTIZ, S.; MUSUMECI, M.R. & TSAI, S.M. Efeito de alguns agrotóxicos na sobrevivência e na atividade respiratória de *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 24: 663-7, 1989.
14. PARAMENSKAYA, L.N.; CHERNOVA, T.A. & KROGLOV, Y.V. The problem of increasing the herbicide resistance of legume-rhizobial symbiosis. *Microbiology*, 67: 351-5, 1998.
15. SPADOTTO, C.A. Monitoração e avaliação de impactos de herbicidas no ambiente. In: Congresso Brasileiro de Ciência das Plantas Daninhas, 23, 2002, Gramado, RS. Palestras, Gramado, RS, SBCPD, 2002, p.128.
16. THURLOW, D.L. & HILBOLD, A.E. Dinitrogen fixation by soybeans in Alabama. *Agronomy Journal*, 77: 432-6, 1985.
17. WILKINSON, V. & LUCAS, R.L. Effects of constituents of Gramoxone W on rates of respiration of soil fungi. *Weed Research*, 2: 288-9, 1969.